Rev. Écol. Biol. Sol, 1982, **19** (4) : 513-523.

La répartition quantitative des microorganismes dans les sols de forêts (chênes, pins). Indices d'activité microbiologique

PAR

G. KILBERTUS, R. SCHWARTZ et G. ALBERTI

Université de Nancy I. Laboratoire de Botanique et de Microbiologie
Centre de 2e Cycle. Boîte Postale n° 239 - 54506 Vandœuvre-lès-Nancy. ER 204, CNRS.

INTRODUCTION

La répartition des germes est très inégale dans le sols (KHAO et CHEN, 1964 ; SEIFERT, 1968) et il existe des zones privilégiées (en particulier les agrégats : KILBERTUS, 1980) renfermant des microhabitats dans lesquels s'opèrent des transformations biochimiques et biologiques directement liées à la composition et à la structure de ce microsite.

Ainsi, la présence d'une microflore propre aux agrégats a été démontrée après sonication du sol, par différents auteurs (HATTORI T. et HATTORI R., 1976 ; BALKWILL *et al.*, 1977 ; SCHWARTZ, 1981). SKINNER (1976), en utilisant la même technique, a prouvé que la biomasse du sol passait de 1,99 mm^3/g, (3700×10^6 germes/g), à 4,96 mm^3/g, (5500×10^6 germes/g). Enfin, KILBERTUS (1980) a pu calculer, à partir de microphotographies électroniques, que la quantité de bactéries dans un agrégat était de 10^9/ml, alors qu'une suspension-dilution classique ne permettait d'en isoler que 10^6/ml.

Cependant, ces travaux restent ponctuels, et ne permettent pas de préjuger des variations de la microflore à l'intérieur et à l'extérieur des agrégats au cours d'un cycle annuel, en relation avec des modifications d'ordre climatique ou écologique. C'est pourquoi nous avons suivi l'évolution annuelle de la quantité de germes, à l'intérieur et à l'extérieur des agrégats, dans deux sta-

Cette étude a été réalisée dans le cadre P.I.R.E.N. dont le thème est : « Conséquences de la monoculture des résineux ».
Reçu le 1-9-82.

tions géographiquement très proches, mais supportant des peuplements végétaux différents.

I. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

A) Stations.

Les deux stations sont situées au nord de la ville d'Orléans (- 45 - France), dans le massif d'Ingrannes :

— une parcelle R, à pins sylvestres, présente une strate herbacée à *Molinia coerulea, Pteridium aquilinum* et *Pseudoscleropodium purum.*

Le sol est un moder, avec une couche H de 2 cm ;

— une parcelle F, à chênes *(Quercus petrae)* avec une strate herbacée composée de *Deschampsia flexuosa, Festuca tenuifolia* et *Teucrium scorodania.*

Le sol de cette station est un mull-moder, présentant une couche F assez épaisse et une forte activité des vers de terre et des pourritures blanches. Le rapport C/N est de 19.

B) Prélèvements.

Ils ont été réalisés chaque mois, de décembre 1980 à décembre 1981, à l'aide d'une sonde pédologique, et à deux niveaux différents : de 0 à — 1 cm, et de — 6 à — 8,5 cm.

C) Sonication.

Nous avons utilisé un ensemble universel à ultrasons, Alcatel-Pons, type 20-200 SV, pourvu d'une sonotrode T 20 ; la gamme choisie est 4, l'intensité 5, ce qui correspond à 100-120 watts.

Après avoir vérifié l'influence de la durée de sonication, en traitant l'échantillon durant 30 secondes, 1, 2 et 5 minutes et en notant l'augmentation de la température, nous avons (pour chaque prélèvement) placé un gramme de sol dans 100 ml d'eau, et soniqué l'ensemble durant une minute à 100-120 W. Une dilution du sol témoin, et une du sol soniqué, ont ensuite été ensemencées sur milieu Nutrient Broth (8 g de Nutrient Broth, 15 g de gélose pour un litre d'eau).

L'efficacité des ultra-sons a également été vérifiée en microscopie électronique à transmission, les sols ayant été traités selon les techniques décrites par KILBERTUS et SCHWARTZ (1981).

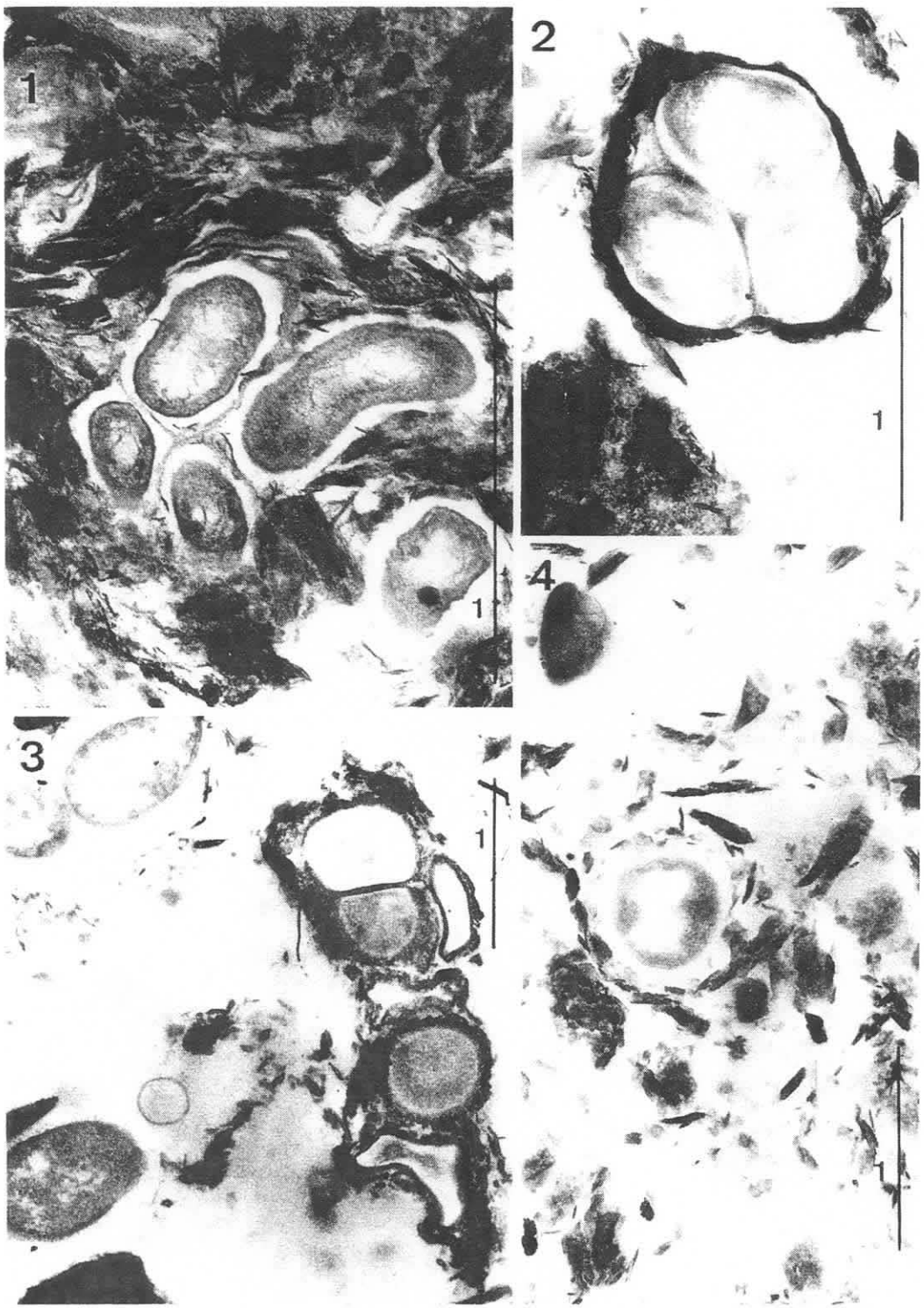
D) Calcul de l'activité biologique globale.

Les chiffres obtenus précédemment pour les microflores totales présentes à l'intérieur et à l'extérieur des agrégats sont rapportés en %, la surface blanche (voir figures 6, 7, 8 et 9) délimitée par la nouvelle courbe est planimétrée, et le rapport surface A sur surface totale est calculé. On obtient ainsi pour la période choisie, le pourcentage moyen de germes libres et « actifs », par rapport à la population totale.

II. — RÉSULTATS

A) Observation en microscopie électronique à transmission.

Les sols étudiés en microscopie électronique à transmission renferment de nombreuses bactéries, souvent emprisonnées à l'intérieur des agrégats



PL. I. — (Les échelles sont données en microns) : 1. Sol non sonique. Présence de colonies bactériennes, d'argile et de matières organiques très compactes. — 2. Sol sonique 2 minutes. Microcolonies procaryotiques subsistantes. — 3. Sol sonique 1 minute. Germes isolés ou par deux. — 4. Sol sonique 5 minutes. Dispersion des argiles.

(Pl. I, 1), ou associées, comme celles décrites par ailleurs par KILBERTUS *et al.* (1979) et KILBERTUS et PROTH (1979).

Après une minute de sonication, on assiste à une désagrégation complète de ces structures (Pl. I, 3) avec présence de très nombreuses bactéries isolées, et, plus rarement, de microcolonies de 2 à 3 individus, entourées par des phyllosilicates (Pl. I, 2 et 3).

Cinq minutes de traitement provoquent une dispersion totale de l'argile (Pl. I, 4) et l'on assiste fréquemment à l'apparition de cellules procaryotiques mortes, ou à la présence de structures membranaires résultant probablement de l'éclatement des bactéries.

Les traitements de 1 et 2 minutes donnent des résultats comparables, et sont satisfaisants du point de vue séparation des germes, même si certaines colonies subsistent. Si 5 minutes aboutissent à une meilleure dispersion, elles entraînent cependant la mort de nombreuses cellules.

B) **Action des ultra-sons sur la quantité des germes isolés.**

Après 2 minutes de sonication, les augmentations de température sont comprises entre 7 et 14° C, mais les températures finales restent compatibles avec la survie et le développement des germes (entre 20 et 34° C).

Le nombre des microorganismes augmente régulièrement jusqu'à une minute de sonication, puis diminue rapidement après deux minutes de traitement (Fig. 1) dans les deux horizons étudiés.

Ces résultats sont conformes aux observations en microscopie électronique à transmission, mais prouvent en plus que, même si les différences entre 1 et 2 minutes ne sont pas perceptibles à l'aide de cette technique, on assiste déjà après 2 minutes à la mort de nombreuses cellules. Cette diminution résulte de la sensibilité variable des germes, les coccis par exemple n'étant que peu affectés (HUGUES, 1951 et SALTON, 1964).

Il faut également tenir compte de la vitalité des germes, une population tellurique étant constituée par un ensemble hétérogène renfermant des microorganismes d'âges variables et à niveau d'activités diverses ; ces facteurs peuvent influer sur l'efficacité des ultra-sons.

C) **Évolution de la microflore « intra » et « extra » agrégat au cours d'un cycle annuel.**

- 1. RÉSINEUX.

— *niveau 1*

Sans sonication, le nombre des microorganismes progresse régulièrement de décembre 1980 ($2{,}8 \times 10^6$ germes par gramme de sol sec) à juin 1980 (340×10^6 germes par gramme de sol sec), puis diminue progressivement jusqu'en décembre 1981 (Fig. 2).

En appliquant à ces mêmes échantillons la sonication de 1 minute, on libère tout au long de l'année entre 10 et 50×10^6 germes supplémentaires par gramme de sol. Le nombre des microorganismes contenus à l'intérieur des

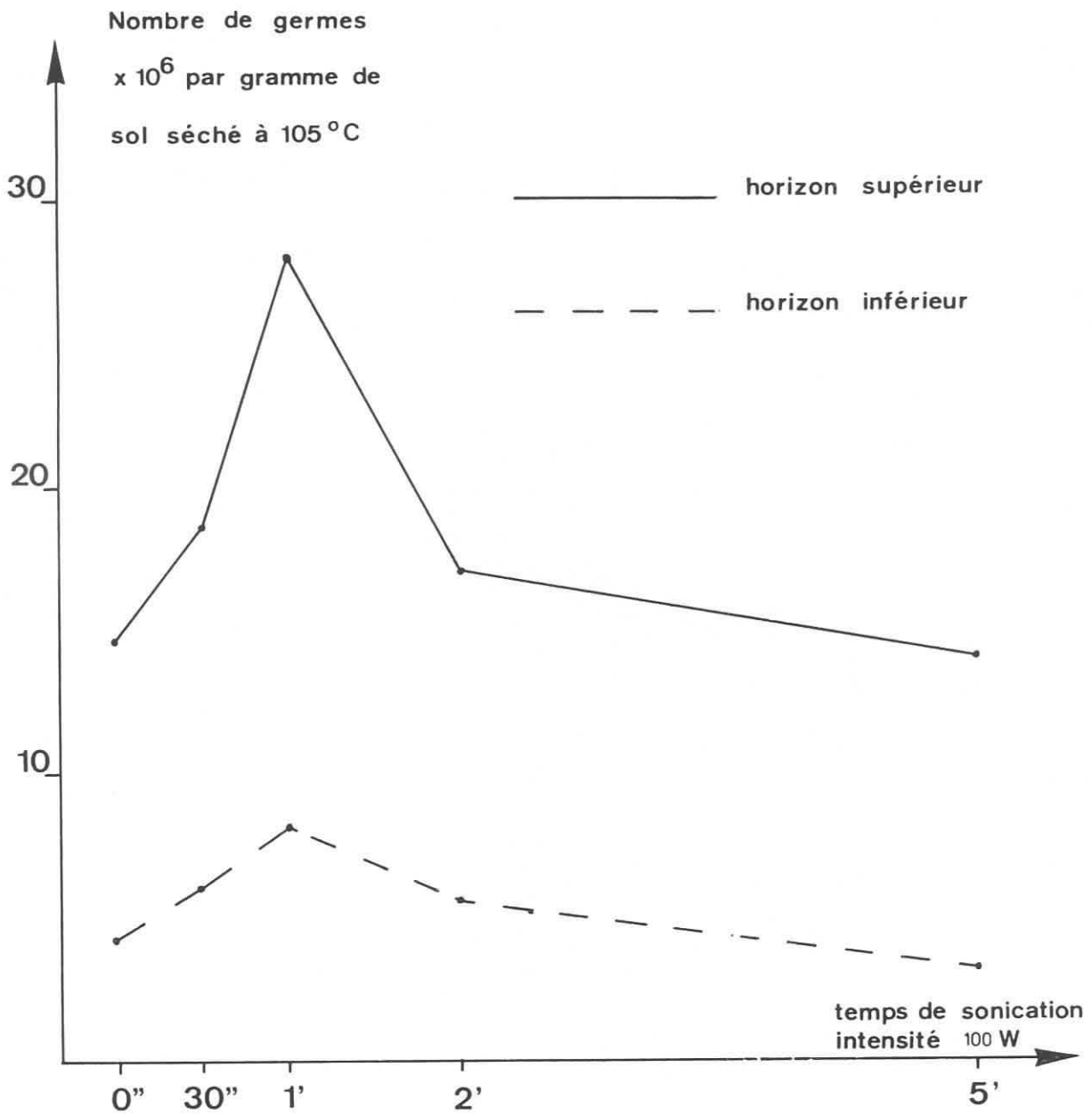


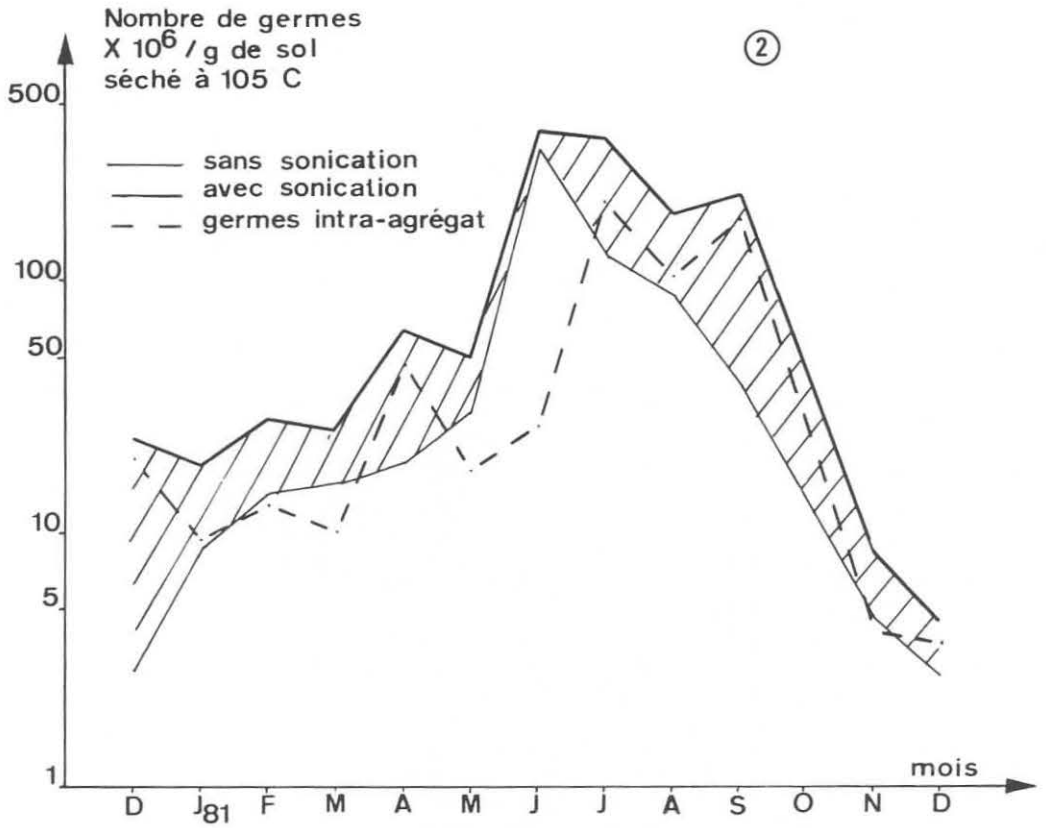
FIG. 1. — Variation du nombre de germes en fonction du temps de sonication.

agrégats, ou sous forme de colonies, est durant cette période proche ou supérieur à celui des procaryotes présents à l'extérieur de ces formations.

— *niveau 2*

La courbe obtenue sans sonication est moins régulière que celle du niveau 1, et l'on constate une diminution du nombre de germes en mars et avril, suivie d'une remontée et d'un pic en juin 1981 (50×10^6 germes par gramme de sol sec) (Fig. 3).

La sonication permet d'obtenir des résultats comparables aux précédents, les germes à l'intérieur des agrégats étant généralement les plus nombreux.



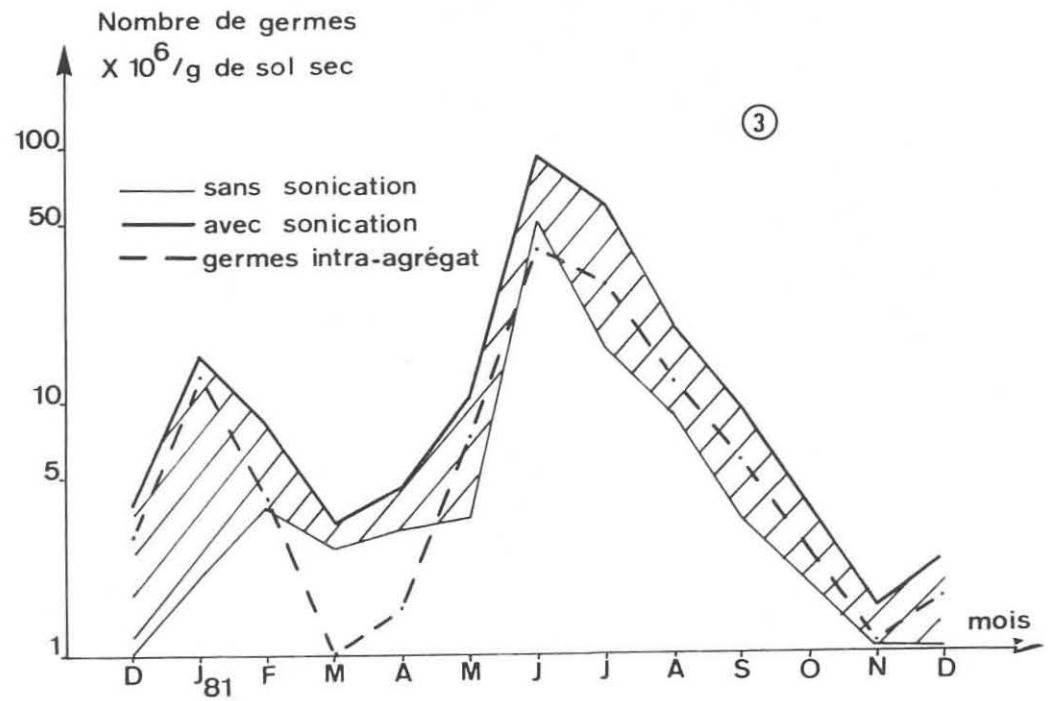


FIG. 2. — Résineux ; niveau 1.
FIG. 3. — Résineux ; niveau 2.

• 2. FEUILLUS.

— *niveau 1*

L'évolution de la microflore totale ne se fait plus de façon aussi régulière que précédemment. Après un premier pic en janvier, on assiste à une baisse plus ou moins régulière jusqu'en avril ($10{,}3 \times 10^6$ germes par gramme de sol sec), suivie d'une remontée jusqu'à 99×10^6 germes par gramme de sol sec, puis d'une descente jusqu'à décembre 1981 (Fig. 4).

En soniquant les sols, on constate que, contrairement aux résultats obtenus avec ceux de la pinède, durant la première période, la microflore contenue à l'intérieur des agrégats est le plus souvent inférieure à celle de l'extérieur. Les variations sont aussi plus grandes : de 1 à $15{,}5 \times 10^6$ germes par gramme de sol sec. Elles se font de façon très irrégulière et plus ou moins rythmique.

— *niveau 2*

Les courbes évoluent de façon parallèle aux précédentes, mais les variations sont beaucoup plus importantes, et les germes externes aux agrégats sont toujours plus abondants (sauf en décembre 1980 et en avril 1981) (Fig. 5).

III. — CONCLUSIONS

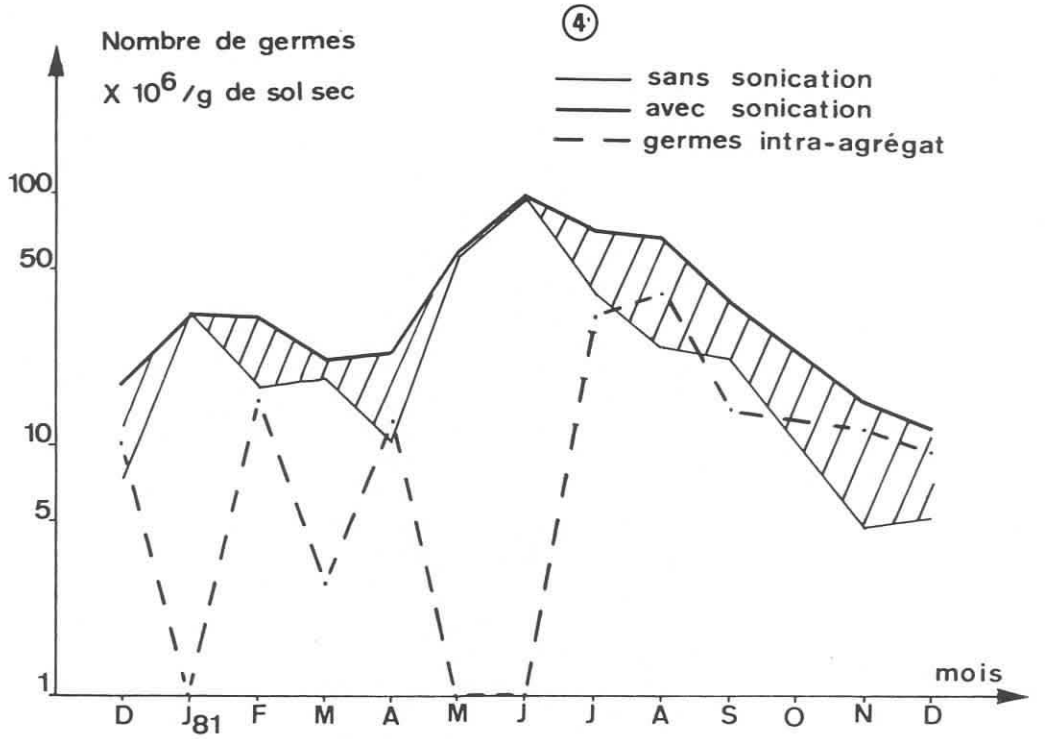
Compte tenu de la sonication, on peut estimer que la microflore totale d'un sol MT est représentée par l'équation :

$$MT = M_{to} + MA_{tx - to}$$

M_{to} est la microflore totale obtenue sans sonication,
MA est la microflore supplémentaire obtenue après une durée de sonication de tx - to (donc la microflore contenue à l'intérieur des agrégats).

M_{to} correspond essentiellement à la fraction de la microflore libre, présente entre les agrégats. Elle réagit immédiatement à l'introduction d'une substance étrangère dans le sol. En outre, ces germes (bactéries et champignons) sont non seulement soumis directement aux variations climatiques ambiantes (dans l'horizon étudié) mais également susceptibles d'être facilement consommés par les nombreux prédateurs qui parcourent le sol à la recherche d'une source trophique.

$MA_{tx - to}$ représente la microflore des agrégats, c'est-à-dire les germes isolés ou sous forme de colonies qui sont présents à l'intérieur de ces formations. Ces microorganismes, même s'ils métabolisent encore certains composés, se développent pour la plupart de façon ralentie, la circulation de l'eau, des aliments et la diffusion des gaz étant fortement ralenties par le diamètre des pores colonisés (2 microns en moyenne selon KILBERTUS en 1980). Cette microflore ne répondra à un stimulus externe qu'après une période de latence plus ou moins longue. C'est ainsi que EL BALKHI *et al.* (1978) ont pu estimer cette dernière à 24 heures en percolant un sol à l'aide de saccharose. Ces auteurs



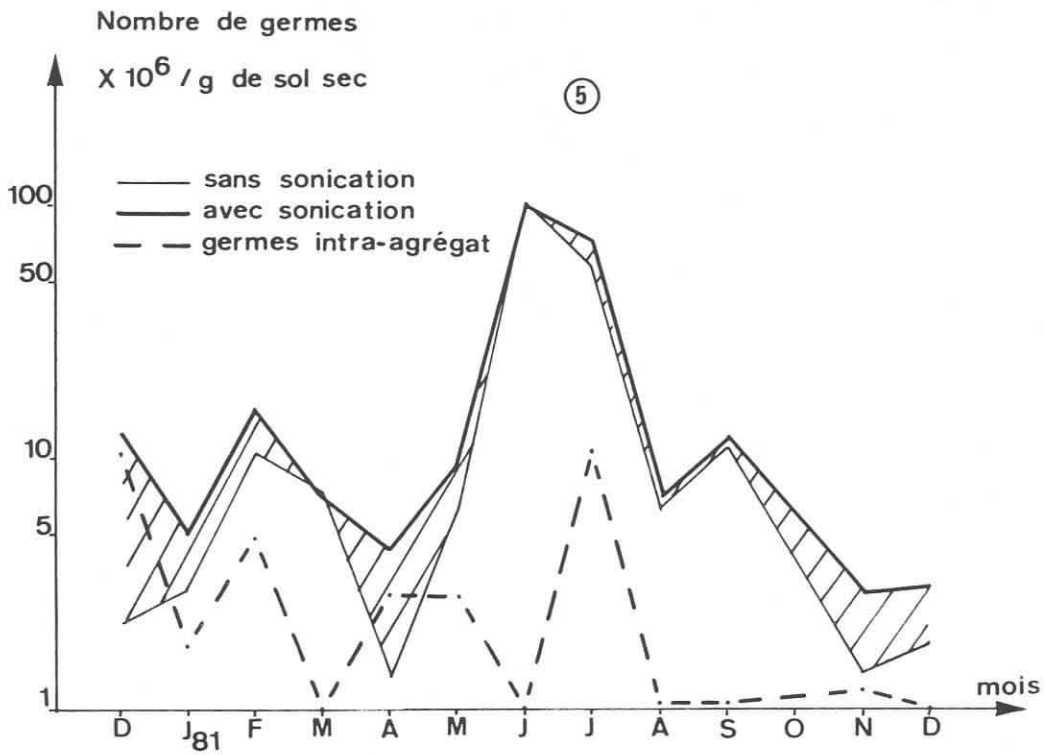


FIG. 4. — Feuillus ; niveau 1.
FIG. 5. — Feuillus ; niveau 2.

n'ont pu en effet constater la libération des germes contenus dans les agrégats qu'après une journée d'expérience.

La fraction MA n'a donc que sporadiquement une activité lytique maximale, et elle constitue une véritable réserve de germes dans le sol.

On peut en déduire que le turn-over n'est pas seulement lié à la quantité de germes présents, mais également à leur activité réelle dans le sol, et, en tenant compte du nombre de microorganismes présents, il sera à un moment donné d'autant plus rapide que le rapport M_{to}/MA (A/I, A = microflore active, I = microflore inactive) sera plus grand.

Comme le montrent les courbes des figures 2 à 5, ce rapport est généralement supérieur à 1, dans les deux horizons sous feuillus, alors que M_{to} est le plus souvent inférieur à MA sous les pins. Cette inaction d'une quantité importante de germes (les microflores totales étant quantitativement voisines) dans les sols sous pins, peut particulièrement s'expliquer par une accumulation temporaire des litières d'aiguilles, aboutissant à une éventuelle dégradation des sols.

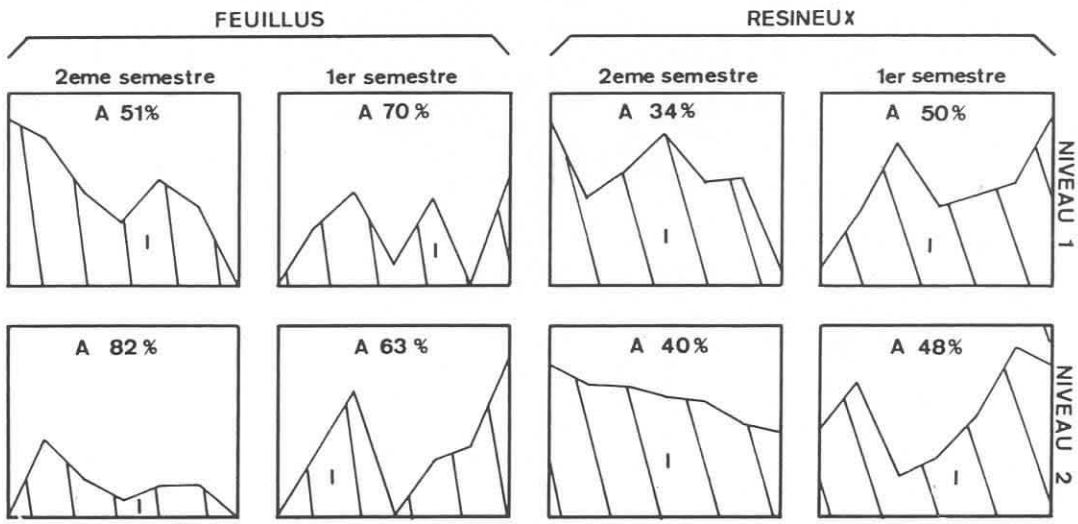


FIG. 6. — Activité biologique semestrielle. Les pourcentages ont été obtenus en rapportant les surfaces « A » à l'ensemble « A + I » — Année 1981 —.

En rapportant les chiffres obtenus précédemment, en pourcentage, on peut estimer l'activité biologique non plus ponctuellement, mais au cours de périodes plus ou moins prolongées. Ainsi, au cours du premier semestre d'étude (Fig. 6), A/I global est proche de 50 % sous les conifères, alors qu'il est proche de 70 % (niveau 1) et 63,4 % (niveau 2) sous feuillus. Les écarts sont encore plus importants au cours du deuxième semestre, puisqu'on obtient 34 à 40 % sous pins contre 51 et 82 % sous chênes.

RÉSUMÉ

Au cours d'un cycle annuel, les auteurs ont étudié la répartition quantitative des microorganismes à l'intérieur et à l'extérieur des agrégats de deux sols forestiers, l'un supportant du pin, l'autre du chêne.

La libération des germes à l'intérieur des agrégats, réalisée par sonication, et vérifiée à l'aide de la microscopie électronique, a prouvé que l'on pouvait obtenir entre 10 et 50 $\times$ 10^6 bactéries supplémentaires par gramme de sol.

L'indice d'activité A/I (microflore active / microflore inactive à l'intérieur) est toujours plus important sous feuillus, traduisant une activité microbienne plus grande.

Summary

Quantitative distribution of microorganisms in forest soils (Oak, Pine Microbial Activity index

Quantitative distribution of microorganisms, inside and outside aggregates, was studied during an annual cycle in two forest soils, one under pine and the other one under oak.

Liberation of microorganisms from the inside of aggregates was effected by sonication and controlled with Electron Microscopy. It revealed the presence of 10-50.10^6 more bacteria per gram of soil, than the usual suspension technique.

The activity index, A/I (active microflora outside aggregates / inactive microflora inside aggregates) was always greater under broadleaved trees, and revealed a greater microbiological activity.

Bibliographie

Balkwill (D. L.), Rucinsky (T. E.) & Casida (L. E.), 1977. — Release of microorganisms from soil with respect to transmission electron microscopy viewing and plate counts. *Anatomie van Leeuwenbroek*, **43**: 73-87.

El Balkhi (M.), Mangenot (F.), Proth (J.) & Kilbertus (G.), 1978. — Influence de la percolation d'une solution de saccharose sur la composition qualitative et quantitative de la microflore bactérienne d'un sol. *Soil Sci. Plant. Nutr.*, **24**: 15-25.

Hattori (T.) & Hattori (R.), 1976. — The physical environment in soil microbiology. An attempt to extend principles of microbiology to soil microorganisms. *Critical Reviews in Microbiology:* 423-461.

Hugues (D. E.), 1951. — Brit. J. Exptl. Pathol., 32, 97. — In « Biology of plant litter decomposition » edited by Dickinson et Pugh. *Academic Press 1974.*

Khao (Y. S.) & Chen (L. T.), 1964. — Composition of microorganisms in agregates of different diameters. *Acta Pedol. Sin.*, **12**: 192-195.

Kilberthus (G.), 1980. — Étude des microhabitats contenus dans les agrégats du sol. Leur relation avec la biomasse et la taille des procaryotes présents. *Rev. Écol. Biol. Sol*, **17**: 543-557.

Kilbertus (G.) & Proth (J.), 1979. — Observation d'un sol forestier (rendzine) en microscopie électronique. *Can. J. Microb.*, **25**: 943-946.

Kilbertus (G.), Proth (J.) & Mangenot (F.), 1979. — 1979. — Variations saisonnières de la microflore d'un sol forestier. *Ann. Microb. Inst. Past.*, **130** B: 63-77.

Kilbertus (G.) & Schwartz (R.), 1981. — Les bactéries du sol — Recherche et détermination. Doc. Nancy I, 185 pages.

SALTON (M. R.T.), 1964. — *The bacteria cell wall. Amsterdam, London,* New York, Elsevier publ. co., 24, sem. XIV, 294 p. fig. E6029.

SCHWARTZ (R.), 1981. — Influence de la monoculture des résineux sur la microflore des sols et la décomposition des litières. Thèse du 3e Cycle. Université de Nancy I. 170 pages.

SEIFERT (J.), 1968. — Determination of weight bacteriel biomass in the soil. *Acta Univ. Carol:* 289-294.

SKINNER (F. A.), 1976. — Methodology in soil examination. *Sol Appl. Bact., Symp. USA,* **4**: 19-35.